

**NUCLEIC ACID FRAGMENT ENCODING POLYPEPTIDE SHOWING NITRILE  
HYDRATASE ACTIVITY, RECOMBINANT PLASMID DNA PPCL 4 ENCODING  
POLYPEPTIDE SHOWING NITRILE HYDRATASE ACTIVITY, STRAIN OF  
BACTERIUM ESCHERICHIA COLI - A PRODUCER OF POLYPEPTIDE SHOWING  
NITRILE HYDRATASE ACTIVITY, AND A METHOD OF NITRILE HYDRATASE  
PREPARING**

**Publication number:** RU2028380

**Publication date:** 1995-02-09

**Inventor:** BEPPU TERUHIKO (JP); YAMADA HIDEAKI (JP);  
NAGASAWA TORU (JP); HORINOUCI SUEHARU  
(JP); NISHIYAMA MAKOTO (JP)

**Applicant:** NITTO CHEMICAL INDUSTRY CO LTD (JP); BEPPU  
TERUHIKO (JP); HIDEAKI YAMADA (JP)

**Classification:**

**- international:** C12N1/21; C12N9/80; C12N9/88; C12N15/09;  
C12N15/55; C12P13/02; C12R1/19; C12R1/38;  
C12N1/21; C12N9/78; C12N9/88; C12N15/09;  
C12N15/55; C12P13/00; (IPC1-7): C12N15/31;  
C12N9/14; C12N9/78; C12P13/02

**- european:** C12N9/80; C12P13/02

**Application number:** SU19914895024 19910227

**Priority number(s):** JP19900048079 19900228

**Also published as:**



EP0444639 (A2)  
JP3251184 (A)  
EP0444639 (A3)  
EP0444639 (B1)  
RU2082761 (C1)

more >>

[Report a data error here](#)

Abstract not available for RU2028380

Abstract of corresponding document: **EP0444639**

The present invention relates to a gene derived from *Pseudomonas chlororaphis* B23 strain which encodes a polypeptide having nitrile hydratase activity being capable of hydrating nitriles to amides. The invention also relates to a recombinant DNA containing the gene, and a transformant transformed with the recombinant DNA. The present invention further relates to a method of producing nitrile hydratase using the transformant and of amides using nitrile hydratase.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide



(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 028 380** <sup>(13)</sup> **C1**

(51) Int. Cl.<sup>6</sup> **C 12 N 15/31, 9/14, C 12 P**

**13/02, C 12 N 9/78**

RUSSIAN AGENCY  
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 4895024/13, 27.02.1991

(30) Priority: 28.02.1990 JP 48079/90

(46) Date of publication: 09.02.1995

(71) Applicant:  
Nitto Kemikal Indastriz Co., Ltd. (JP),  
Terukhiko Beppu (JP),  
Khideaki Jamada (JP)

(72) Inventor: Terukhiko Beppu[JP],  
Khideaki Jamada[JP], Toru  
Nagasava[JP], Suekharu Khorinouti[JP], Makato  
Nisijama[JP]

(73) Proprietor:  
Nitto Kemikal Indastriz Co., Ltd. (JP),  
Terukhiko Beppu (JP),  
Khideaki Jamada (JP)

(54) NUCLEIC ACID FRAGMENT ENCODING POLYPEPTIDE SHOWING NITRILE HYDRATASE ACTIVITY, RECOMBINANT PLASMID DNA PPCL 4 ENCODING POLYPEPTIDE SHOWING NITRILE HYDRATASE ACTIVITY, STRAIN OF BACTERIUM ESCHERICHIA COLI - A PRODUCER OF POLYPEPTIDE SHOWING NITRILE HYDRATASE ACTIVITY, AND A METHOD OF NITRILE HYDRATASE PREPARING

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology, genetic engineering. SUBSTANCE: DNA fragment encoding polypeptide showing nitrile hydratase activity is prepared from the bacterial cells *Pseudomonas chlororaphis* B23. This nitrile hydratase shows capability to hydrate nitriles to amides. Recombinant

DNA containing this gene and transformant formed by transformation of strain *E. coli* with recombinant DNA were prepared. Invention involves also a method of nitrile hydratase preparing using this transformant. EFFECT: preparing of DNA fragment indicated above. 5 cl, 10 dwg

RU 2 028 380 C1

RU 2 028 380 C1

Изобретение относится к гену, который получен из *Pseudomonas chlororaphis* B23 и который кодирует полипептид, обладающий активностью нитрилгидратазы, гидратирующей нитрилы в амиды. Изобретение относится к рекомбинантной ДНК, содержащей ген, и трансформанту, трансформированному этой рекомбинантной ДНК. Изобретение относится, кроме того, к способу получения нитрил гидратазы, используя трансформант, и амидов, используя нитрил гидратазу.

Нитрилгидратаза или нитрилаза известна как фермент, который гидратирует нитрилы в амиды. Микроорганизмы, которые продуцируют нитрил гидратазу, включают те, которые принадлежат роду *Bacillus*, роду *Bacteridium* роду *Micrococcus* и роду *Brocibacterium* (см. JP-B-62-21517/1989, патент США N 4001081), роду *Corynebacterium* и роду *Vocardia* (см. JP-B-56-17918/1989, патент США 4248968), роду *Pseudomonas* (см. JP B-59-37951/1984, патент США 4637982), роду *Rhodococcus*, роду *Arthrobacter* и роду *Microbacterium* (см. JP-A-61-162193/1986, EP-A-0188316) и *Rhodococcus rhodochrous* (см. JP-A-2-470/1990, EP-A-0307928).

Нитрилгидратаза использовалась для гидратации нитрилов в амиды. Конструируются микроорганизмы, содержащие несколько копий рекомбинантной ДНК, кодирующей нитрилгидратазу, с использованием приемов рекомбинантной ДНК. Рекомбинант продуцирует значительные уровни нитрилгидратазы по сравнению с известными приемами.

Предложен ранее ген, полученный из *Rhodococcus* вида N-774 (FERM BP-1936), который также кодирует полипептид, обладающий активностью нитрилгидратазы (JP-A-2-119778/1988). Напротив, в соответствии с настоящим изобретением используют ген, полученный из *Pseudomonas chlororaphis* B23, описанный в патенте США N 4637982 для продуцирования нитрилгидратазы. Выделен ген, кодирующий нитрилгидратазу, вставил ген в соответствующий вектор плазмиды и трансформировал соответствующего хозяина этой рекомбинантной плазмидой, получая таким образом трансформант, продуцирующий нитрилгидратазу.

Изобретение относится к 1) гену, кодирующему полипептид, который обладает активностью нитрилгидратазы и который содержит  $\alpha$ -субблок со следующей аминокислотной последовательностью:

|                  |                  |
|------------------|------------------|
| MetSerThrSer15   | SerThrThrAlaT10  |
| ProSerThrProG15  | GluArgAlaTrpA20  |
| LeuPheGlnValL 25 | LysSerLysGluL30  |
| IleProGluGlyT35  | ValGluGlnLeuT40  |
| GlnLeuMetAlaH45  | AspTrpSerProG50  |
| AsnGlyAlaArgV55  | ValAlaLysAlaT60  |
| ValAspProGlnP65  | ArgAlaLeuLeuL 70 |

|                  |                               |
|------------------|-------------------------------|
| LysAspGlyThrA75  | AlaCysAlaGlnP80               |
| GlyTyrThrGlyP85  | GlnGlyGluTyrI90               |
| ValAlaLeuGluA95  | ThrProGlyValI100 AsnValIleVal |
| SerLeuCysSer110  | ThrAsnTrpProI115              |
| LeuGlyLeuProI120 | GluTrpTyrLysI125              |
| PheGluPheArgI130 | ArgLeuValArgI135              |
| GlyArgThrValI140 | ArgGluLeuGlyI145              |
| GluLeuProSerI150 | ThrValIleLysI155              |
| TrpAspThrSerI160 | GluSerArgTyrI165              |
| ValLeuProGlnI170 | ProGluGlySerI175              |
| HisMetSerGluI180 | GlnLeuGlnGlnI185              |
| ValThrLysAspI190 | LeuIleGlyValI195              |
| LeuProArgVal200  |                               |

и  $\beta$ -субъединицу со следующей аминокислотной последовательностью:

|                  |                               |
|------------------|-------------------------------|
| MetAspGlyPheH15  | AspLeuGlyGlyP10               |
| GlnGlyPheGlyL15  | ValProHisThrI20               |
| AsnSerLeuSerT25  | LysGlnValPheL30               |
| GlnAspTrpGluH35  | LeuAlaTyrSerL40               |
| MetPheValGlyV45  | AspGlnLeuLysL50               |
| PheSerValAspG55  | ValArgHisAlaV60               |
| GluArgLeuAspV65  | ArgGlnHisValG70               |
| ThrGlnTyrTyrG75  | ArgTyrIleIleA80               |
| ThrAlaThrLeuL85  | ValGluThrGlyV90               |
| IleThrGlnAlaG95  | LeuAspGlnAlaI100              |
| GlySerHisPheI105 | LeuAlaAsnProI110              |
| HisAlaThrGlyI115 | ProAlaIleThrI120              |
| ArgProProPheI125 | ValGlyAspArgI130              |
| ValValArgAspI135 | TyrValAlaGlyI140              |
| IleArgMetProI145 | TyrValArgGlyI150 GluGlyValVal |
| HisArgThrSerI160 | GlnTrpProPheI165              |
| AspAlaIleGlyI170 | GlyAspLeuSerI175              |
| AlaHisGlnProI180 | TyrHisValGluI185              |
| ArgValLysAspI190 | TrpGlyAspAlaI195              |

AspAspGlyTyr200 ValValAspLeu205  
 Val Phe  
 GluSerTyrLeu210 LysAlaProGly215  
 Asp Ala  
 GlnAlaValAsn220  
 Ala

2) гену, описанному в (1),  
 кодирующему  $\alpha$ - и  $\beta$ -субблоку, содержащему  
 кодирующую  $\alpha$ -субблок  
 последовательностью

15 30 45  
 ATGAGTACATCTATTTCCACGACTGCGAC  
 ACCTTCGACACCCGGC  
 60 75 90  
 GAGAGGGCATGGGCCTTGTTCAGTGC  
 TCAAGAGCAAGGAAGCTC  
 105 120 135  
 ATCCAGAGGGCTATGTCGAGCAGCTCA  
 CTCATTGATGGCCCAT  
 150 165 180  
 GACTGGAGCCCGGAGAACGGCGCTCGC  
 GTGGTCGCCAAGGCATGG  
 195 210 225  
 GTCGATCCGCGAGTTCGGGCGCTGCTGC  
 TCAAGGACGGAACAGCC  
 240 255 270  
 GCTTGCGCGCAGTTCGGCTACACCGGCC  
 CACAAGGCGAATACATC  
 285 300 315  
 GTCGCCCTGGAAGATACACCGGGGGTGA  
 AGAACGTCATCGTCTGC  
 330 345 360  
 AGCCTGTGCTCCTGCACCAACTGGCCGG  
 TCCTCGGCCTGCCGCC  
 375 390 405  
 GAGTGGTACAAGGGCTTTGAGTTTCGTG  
 CGCGCCTGGTCCGGGAG  
 420 435 450  
 GGGCGCACCGTACTGCGCGAGCTGGGG  
 ACGGAGTTGCCGAGCGAC  
 465 480 495  
 ACGGTCATCAAGTCTGGGATACACGCG  
 CCGAAAGCCGTTACCTG  
 510 525 540  
 GTGTTGCCGCAAAGGCCTGAAGGCTCTG  
 AGCATAGAGTGAAGAA  
 555 570 585  
 CAGCTTCAACAGCTGGTGACCAAAGACG  
 TGCTGATTGGCGTCCG  
 600  
 CTGCCACGCGTTGGC  
 и последовательность,  
 кодирующую  $\beta$ -субъединицу:  
 15 30 45  
 ATGGATGGCTTTCACGATCTCGGCGGTTT  
 CCAAGGCTTTGGCAAA  
 65 75 90  
 GTGCCGCACACCATCAACAGCCTCAGCT  
 ACAAACAGGTTTTCAAG  
 105 120 135  
 CAGGACTGGGAACACCTGGCCTATAGCT  
 TGATGTTTGTCCGCGTT  
 150 165 180  
 GACCAATTGAAAAAGTTACGCGTGACGA  
 AGTGGCTCATGCCGTC  
 195 210 225  
 GAACGCCTGGACGTTCCGCCAGCATGTGC  
 GCACCCAGTACTACGAA  
 240 255 270  
 CGCTACATCATCGCGACCGCCACGCTGC  
 TGGTGGAACGGGCGTT  
 285 300 315  
 ATACCCAGGCGGAGCTCGATCAGGCAT  
 TGGGTTCCCACTTCAAG

330 345 360  
 CTGGCGAACCCCGCCCATGCGACAGGTC  
 GCCCGGCGATCACCGGC  
 375 390 405  
 AGGCCGCTTTCGAAAGTGGGCGATCGGG  
 5 TTGTGGTTCGAGACGAA  
 420 435 450  
 TATGTGGCGGGGCATATCCGCATGCCGG  
 CCTACGTGCCGCGTAAG  
 465 480 495  
 GAAGGCGTGGTCTGCACCGCACCTCAG  
 10 AGCAGTGGCCCTTCCCC  
 510 525 540  
 GACGCCATTGGCCACGGCGACTTGAGCG  
 CAGCCCATCAGCCTACC  
 555 570 585  
 TACCACGTCGAGTTTCGCGTGAAAGATCT  
 15 ATGGGGTGACGCGGCA  
 600 615 630  
 GATGACGGTTACGTCGTGGTTCGATCTTT  
 CGAAAGCTACTTGGAT  
 645 660  
 20 AAGGCCCCCGGTGCCCAAGCGGTGAACG  
 CA

3) рекомбинантной ДНК, содержащей  
 вектор, включающий ген, описанный в [1] или  
 [2]; 4) трансформанту, трансформированному  
 рекомбинантной ДНК, описанной в [3]; 5)  
 25 способу продуцирования нитрилгидратазы,  
 который содержит культивирование  
 трансформанта, и выделение  
 нитрилгидратазы из культуры; 6) способу  
 продуцирования амидов, который содержит  
 гидратирование нитрилов, используя  
 30 нитрилгидратазу, с целью получения амидов;  
 7) способу получения амидов, который  
 содержит культивирование трансформанта и  
 гидратирование нитрилов, используя  
 35 полученную в результате культуры  
 изолированных бактериальных клеток,  
 обработанных им, или фиксированным их  
 материалом, чтобы получить амиды.  
 Изоляция и очистка нитрилгидратазы и  
 частичный анализ последовательности  
 аминокислот нитрилгидратазы.

40 Нитрилгидратазу изолируют и подвергают  
 очистке из *Pseudomonas chlororaphis* B 23 и  
 разделяют между  $\alpha$  и  $\beta$  субблоками,  
 используя ЖХВД (жидкостную хроматографию  
 под высоким давлением). Определяют часть  
 45 аминокислотной последовательности  
 субблоками (фиг.1).

Получение ДНК-зонда для гена  
 нитрилгидратазы.  
 ДНК-зонд получают из штамма J M105/ру  
 V K121 (FERM BP-1937), как это описано в  
 50 JP-A-2-119778/1990, благодаря высокой  
 степени гомологичности в аминокислотной  
 последовательности между  $\beta$ -субблоком  
 нитрилгидратазы *Rhodococcus* вида N-744,  
 описанным в вышеупомянутой Японской  
 55 Государственной Патентной Газете, и  
 соответствующим  $\beta$ -субблоком *Pseudomonas*  
*chlororaphis* B23. Плазмиду PyVK121,  
 содержащую ген нитрилгидратазы,  
 полученный из *Rhodococcus* вида N-744,  
 приготавливают из культуры JM105/руVK121,  
 ДНК рУVK121 переваривают при помощи  
 60 ферментов Sph I и Sal I. Фрагмент Sph I-Sal  
 I содержит ген нитрилгидратазы (фиг. 2-5)  
*Rhodococcus* вида N-744. ДНК-фрагмент  
 метят радиоизотопом, чтобы получить зонд.

Обнаружение ДНК-сегмента, содержащего  
 ген нитрилгидратазы из хромосомы  
*Pseudomonas chlororaphis* B 23.

Хромосомную ДНК получают из культуры *Pseudomonas chlororaphis* B23. Хромосомную ДНК переваривают ферментами рестрикции и подвергают гибридизации с зондом, описанным в [2], используя процедуру гибридизации Саутерна (Саутерн, Э.М., J Mol. Biol., т.98, с. 503 (1975)). Просеивают два ДНК-фрагмента различной длины.

Конструкция рекомбинантной плазмиды. Рекомбинантную плазмиду конструируют при помощи вставки фрагмента хромосомной ДНК, полученной в [3], в вектор плазмиды.

Трансформация и просеивание трансформанта, содержащего рекомбинантную плазмиду. Трансформанты получают с использованием известной рекомбинантной плазмиды. Трансформант, содержащий рекомбинантную плазмиду, подвергают селекции с использованием зонда, описанного в [2], в соответствии с процедурой гибридизации колоний (Р.Брюс Уоллес и др. NUC/ Accl. Res., т.9, с.879 (1981)). Кроме того, присутствие гена нитрилгидратазы в рекомбинантной плазмиде подтверждают при помощи процедуры гибридизации Саутерна. Отобранные таким образом плазмиды обозначают рPCN1 и рPCN3.

6) Изоляция и очистка ДНК-плазмиды, и конструкция карты рестрикции. ДНК плазмид рPCN1 и рPCN3, изолируют и подвергают очистке. Конструируют карту рестрикции ДНК (фиг.6), чтобы определить область, содержащую ген нитрилгидратазы.

7) Анализ ДНК-последовательности. Дополнительный сегмент вставленного ДНК-фрагмента в рPCN1 и рPCN3 расщепляют с использованием соответствующего фермента рестрикции. Вставленный ДНК-фрагмент затем используют для анализа последовательности. Нуклеотидная последовательность ДНК-фрагмента (фиг.7-10) показывает, что она содержит последовательность, полученную из аминокислотной последовательности, как это описано в (1).

8) Вставка ДНК-фрагмента в вектор экспрессии и трансформация. ДНК-фрагмент отсекают от рPCN1 и рPCN3, используют соответствующие ферменты рестрикции. Эти два фрагмента подвергают лигации и вставляют в вектор экспрессии рVC19. Эту конструкцию используют для трансформации *E.coli* JM105 (Амершэм) и этот трансформант обозначают через JM105/рPCN4.

9) Продукция нитрилгидратазы с использованием трансформанта и превращение нитрилов в амиды. Культивируют трансформант, описанный в (8). Бактериальные клетки смешивают с нитрилами, субстратом нитрилгидратазы и получают амиды.

*Pseudomonas chlororaphis* B23 сдан на хранение в Исследовательский институт ферментации. Агентство по промышленной науке и технологии, и ему присвоен шифр хранения FERM BP-187. Трансформант JM105/рPCN4 сдан на хранение в тот же институт и ему присвоен шифр хранения FERM BR-2779.

Любой вектор, включающий вектор плазмиды (например, рАТ 153, рМР9, рHC624, рКС7, и т.д.), вектор фага (например,  $\lambda$  gt II (Тоинобо), Чарон 4А (Амершэм) и т.д.) можно использовать в соответствии с настоящим

изобретением. Ферменты, которые можно при этом использовать включают Sph I, Sal I, Sac, Bam, Hl, EcoRI, Pst I и т.д., которые производятся промышленностью (фирма Такара Шузо). Самых разнообразных хозяев можно использовать для трансформации, например, *E.coli*, JM105 и TGI (но ими не исчерпывается весь список). Культурной средой для трансформанта может быть любая среда, которую в общем случае используют для этих целей.

Превращение нитрилов в амиды осуществляют с использованием нитрилгидратазы, неочищенной нитрилгидратазы, культуры трансформанта, изолированных бактериальных клеток или их обработанного материала и т.п., полученных из культуры трансформанта.

Соответствующие нитрилы настоящего изобретения включают те, которые содержат 2-4 атома углерода, также, как ацетонитрил, пропионитрил, акрилонитрил, метакрилонитрил, н-бутиронитрил и изобутилонитрил, причем акрилонитрил является предпочтительным.

На фиг.1 показана N-терминальная аминокислотная последовательность  $\alpha$ - и  $\beta$ -субблоков нитрилгидратазы, полученной с использованием *Pseudomonas chlororaphis* B 23; на фиг.2-5 - ДНК-последовательность гена нитрилгидратазы *Rhodococcus* вида N-774, использованная в качестве ДН-зонда; на фиг.6 - частичные карты рестрикции рекомбинантных плазмид, рPCN1, рPCN3 и рPCN4; на фиг. 7-10 - нуклеотидная последовательность ДНК-вставки в рPCN3, полученная из B23, и выделенная аминокислотная последовательность.

В соответствии с настоящим изобретением предлагается аминокислотная последовательность и нуклеотидная последовательность  $\alpha$ - и  $\beta$ -субблоков нитрил-гидратазы, получены из *Pseudomonas chlororaphis* B23. Ген, кодирующий нитрилгидратазу, вставляют в вектор экспрессии, а рекомбинантный вектор используют для трансформации. Трансформант содержит несколько копий гена и продуцирует более высокие концентрации нитрилгидратазы по сравнению с известными, используемыми для этих целей, микроорганизмами.

Изобретение описано подробно в приводном ниже примере. В этом примере используют следующие сокращения.

ТЕ: трис-HCl (10 мМ, pH 7,8), ЭДТК (1 мМ, pH 8,0)

TNE: трис-HCl (50 мМ, pH 8,0), ЭДТК (1 мМ, pH 8,0), NaCl (50 мМ)

TE: трис-HCl (50 мМ, pH 8,0), ЭДТК (5 мМ, pH 8,0), сахароза (35 мМ)

Среда 2 ХУТ: 1,6% Триптон, 1,0% экстракт дрожжей, 0,5% NaCl

1. Изоляция и очистка нитрилгидратазы и анализ аминокислотной последовательности части нитрилгидратазы *Pseudomonas chlororaphis* B23 культивировали в среде (10 г/л сахарозы, 4 г/л метакриламида, 0,5 г/л  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 г/л  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,5 г/л  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,01 г/л  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , pH 7,0) при 25°C в течение 28 ч. Бактериальные клетки собирали. 100 г бактериальных клеток разрушали и фракционировали при помощи сульфата аммония. Пробу подвергали диализу и диализат подвергали

центрифугированию. Верхний слой удаляли и загружали на хроматографическую колонну ДЕАЕ-Сефадекс, Октил-Сефароза КЛ-4Б, Фенил-Сефароза КЛ-4Б и Сефадекс-Г-150. Активные фракции собирали и подвергали диализу. Диализат, содержащий фермент, загружали на колонну высокоэффективной жидкостной хроматографии, используя обращенно-фазовую колонну (Сеншу Цак ВР-304-1251, Сеншу Кагаку) и получали два субблока ( $\alpha$  и  $\beta$ ), N-терминальную аминокислотную последовательность  $\alpha$ - и  $\beta$ -субблоков определяли с использованием анализатора аминокислотных последовательностей (фирмы Апплайед Биосистемз, Модели 470А), N-терминальные аминокислотные последовательности  $\alpha$ - и  $\beta$ -субблоков приведены на фиг.1.

2. Получение ДНК-зонда для гена нитрилгидратазы *E.coli* JM105, содержащую рУVK121 (FERM BP-1927), культивировали в 100 мл среды 2 х УТ, содержащей 50  $\mu$  г/мл ампициллина, при 30°C в течение ночи (12 ч). Бактериальные клетки собирали и в клетки добавляли TNE. Суспензию клеток затем подвергали центрифугированию. В таблетку добавляли 8 мл STE и 10 мг лизоцима. Смесь инкубировали при 0°C в течение 5 мин, затем добавляли 4 мл 0,25 М ЭДТК. Далее, добавляли в смесь при комнатной температуре 2 мл 10% ДСН (додecil сульфата натрия пер.) и 5 мл 5М NaCl. Полученную в результате смесь выдерживали при 0-4°C в течение 3 ч, а затем подвергали ультрацентрифугированию. В верхний слой добавляли 1/2 объема 30% ПЕГ 6000. Смесь выдерживали при 0-4°C в течение ночи (12 ч) и подвергали центрифугированию. В таблетку добавляли TNE, чтобы получить объем 7,5 мл, а затем в суспензию добавляли CSCI. Смесь подвергали центрифугированию, чтобы удалить протеины. Далее в верхний слой добавляли 300-500 мг/мл бромида этидия. Смесь переносили в пробирку для центрифугирования. Пробирку запаивали, а затем подвергали ультрацентрифугированию. ДНК экстрагировали, используя перистальтический насос. В экстракт, чтобы удалить бромид этидия, добавляли несколько больше, чем равное количество изопропилового спирта, насыщенного водой. Пробу подвергали диализу против TE. Получали примерно 3 мл очищенной рУVK121.

рУVK121 ДНК переваривали ферментами Sph I и Sal I, получая в результате ДНК-фрагмент в 2,07 ко (килооснования - пер.), содержащий ген нитрилгидратазы, полученный и *Rpodosococcus* вида N-774. Фрагмент метили радиоизотопом  $^{32}$ P, чтобы получить зонд. Нуклеотидная последовательность зонда приведена на фиг.2-5.

3. Получение ДНК-фрагмента, содержащего ген нитрилгидратазы хромосомы. *Pseudomonas chlorographis* B23 культивировали в 100 мл среды, описанной [1]. Бактериальные клетки собирали и таблетку промывали при помощи TNE. Затем таблетку суспендировали в 10 мл TE. В суспензию добавляли 4 мл 0,25М ЭДТК, 10-20 мг лизоцима, 10-20 мл ахромопротеазы и 10 мл 10% ДСН. Суспензию инкубировали при 37 °C в течение 3 ч. В суспензию добавляли

15 мл фенола. Смесь инкубировали при комнатной температуре 60°C в течение 15 мин, а затем центрифугировали. В 15 мл верхнего слоя добавляли 0,7 мл 2,5М ацетата натрия и диэтиловый простой эфир, смесь центрифугировали. Верхний слой сбрасывали. В нижний слой добавляли два объема этанола и ДНК удаляли стеклянным стержнем. ДНК промывали в течение 5 мин при помощи смеси TE : этанол 2:8, 1:9 и 0:10 (о/о). ДНК затем снова суспендировали в 2-4 мл TE (37°C). 10  $\mu$  л смеси РНазы А и Т<sub>1</sub> добавляли в суспензию смесь инкубировали при 37°C. В смесь добавляли равное количество фенола, а затем подвергали центрифугированию. В 2-4 мл верхнего слоя добавляли больше, чем равное количество простого эфира. Смесь подвергали центрифугированию. После центрифугирования верхний слой сбрасывали. Нижний слой подвергали диализу относительно 2 л TE, содержащего небольшое количество хлороформа, в течение ночи, а затем диализу относительно свежего TE в течение 3-4 чл. Получали 4 мл неочищенной хромосомной ДНК. Переваривание ферментом хромосомной ДНК осуществляли следующим образом:

а) 2  $\mu$  л Sac I + 3  $\mu$  л реакционного буфера (10x) + 15 л хромосомной ДНК + 10  $\mu$  л TE

в) 2  $\mu$  л Bam HI + 2  $\mu$  л Sal I + 3  $\mu$  л реакционного буфера (10x) + 15  $\mu$  л хромосомной ДНК + 10  $\mu$  л TE.

Смесь инкубировали при 37°C в течение 1 ч, а затем подвергали электрофорезу на геле агарозы при разности потенциалов 60 В в течение 3 ч. Гибридизацию Саутерна хромосомной ДНК осуществляли с использованием зонда, описанного в (2). Обнаруживали фрагменты в примерно 4,6 ко и 4,7 ко, что говорит о сильной гибридизации. 15  $\mu$  л хромосомной ДНК переваривали при помощи Sac I Bam HI и Sal I и подвергали электрофорезу на геле агарозы, как это было описано выше. ДНК-фрагменты в 4,6 ко и 4,7 ко срезали с геля и переносили в три объема 8М NaClO<sub>4</sub>. Раствор наносили каплями на фильтровальную бумагу GF/C/Ватман/ (диаметр 6 мм). На фильтровальную бумагу добавляли десять капель ( $\approx$  100  $\mu$  л) TE, содержащего 6М NaClO<sub>4</sub>, и десять капель ( $\approx$  100  $\mu$  л) 95% этанола. Затем бумагу сушили воздухом и помещали в 0,5 мл пробирку Эппендорфа. В пробирку добавляли 40  $\mu$  л TE и все это инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Затем пробирку центрифугировали. Получали примерно 40  $\mu$  л верхнего слоя, который содержал ДНК-фрагменты в 4,6 ко и 4,7 ко, содержащие ген нитрилгидратазы хромосомной ДНК.

4. Вставка хромосомного ДНК-фрагмента в вектор.

а) ДНК-фрагмента 4,6 ко

2  $\mu$  л Sac I, 3  $\mu$  л реакционного буфера (10x) и 10 мл TE добавляли в 10  $\mu$  л ДНК рVC18. Смесь инкубировали при температуре 37°C в течение 1 ч. 2  $\mu$  л 0,25М ЭДТК добавляли в смесь, чтобы прекратить реакцию. Затем в смесь добавляли 7  $\mu$  л ТМ Трис-HCl (рН 9) и 3  $\mu$  л БДФ (бактериальной щелочной фосфатазы). Смесь инкубировали

при 65°C в течение 1 ч. Затем в смесь добавляли ТЕ, чтобы довести общий объем до 100  $\mu$ л. Смесь экстрагировали 3х равным количеством фенола. В экстракт добавляли равное количество простого эфира. Нижний слой удаляли и в нижний слой добавляли 10  $\mu$ л 3М ацетат натрия и 250  $\mu$ л этанола. Смесь инкубировали при -80°C в течение 30 мин, подвергали центрифугированию. Сушили и снова суспендировали в ТЕ.

Полученные таким образом 5  $\mu$ л ДНК Р С18 и 40  $\mu$ л ДНК-фрагмента в 4,6 ко, описанного в (3), смешивали. В смесь добавляли 6  $\mu$ л буфера лигации, 6  $\mu$ л АТФ (6 мг/мл) и 3  $\mu$ л ДНК Т4-лигазы. Смесь инкубировали при 4°C в течение ночи (12 ч), чтобы получить рекомбинантную плазмиду, содержащую ДНК-фрагмент в 4,6 ко в Сайте Sal I ч PVC18.

в) ДНК-фрагмент в 4,7 ко рVC18 переваривали при помощи Bam HI и Sal I. ДНК-фрагмент в 4,7 ко вставляли в сайт Bam HI - Sal I в рVC18 точно так же, как это описано в (4а). Получали рекомбинантную плазмиду, содержащую ДНК-фрагмент в 4,7 ко в сайте Bam HI - Sal I.

5. Трансформация и просеивание трансформантов.

*E. coli* JM105 (Амерцэм) прививали на 10 мл среды 2 х УТ и инкубировали при 37°C в течение 12 ч. После инкубирования полученную в результате культуру добавляли в свежую среду 2 х УТ до концентрации 1%, смесь инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Культуру подвергали центрифугированию и таблетку суспендировали в 5 мл холодного 50 мМ CaCl<sub>2</sub>. Суспензию помещали в температуру 0°C на 40 мин, а затем подвергали центрифугированию. В таблетку в отдельной пробирке добавляли 0,25 мл холодного 50 мМ CaCl<sub>2</sub> и 60  $\mu$ л каждой из рекомбинантных плазмид, полученных в (4а,в). Смесь инкубировали при 0°C в течение 40 мин, подвергали термическому удару до 42°C в течение 2 мин, помещали в температуру 0°C 5 мин и добавляли в 10 мл среды 2 х УТ. Смесь инкубировали при 37°C в течение 90 мин при встряхивании, затем центрифугировали. Таблетку суспендировали в 1 мл среды 2 х УТ и 10  $\mu$ л суспензии наносили на агарозную пластинку 2 х УТ, содержащую 50  $\mu$ г/мл ампициллина. Пластинку инкубировали при 37°C. Колонии выращивали на пластинке, затем подвергали селекции методом гибридизации колонии: Колонию переносили на нитроцеллюлозные фильтр и переваривали. ДНК фиксировали на фильтре и гибридизировали с зондом, описанным в [2]. Фильтр подвергали автордиографии и отбирали рекомбинантную колонию. Кроме того, присутствие гена нитрилгидратазы в трансформанте подтверждали в соответствии с процедурой гибридизации Саутерна.

б) Изоляция и очистка рекомбинантной плазмиды и конструкция карты рестрикции вставленных ДНК-фрагментов.

Трансформант выращивали в 100 мл среды 2 х УТ, содержащей 50  $\mu$ г/мл ампициллина при 37°C в течение ночи (12 ч). Бактериальные клетки собирали и в клетки добавляли TNE. Клетки собирали снова

центрифугированием и в клетки добавляли 8 мл ТЕ и 10 мг лизоцима. Смесь инкубировали при 0°C в течение 5 мин. В смесь добавляли 4 мл 0,25 м ЭДТК, 2 мл 10% ДСН (при комнатной температуре) и 5 мл 5М NaCl. Смесь инкубировали при 0-4°C в течение 3 ч и подвергали ультрацентрифугированию. В верхний слой добавляли 1/2 объема 30- ПЕН 6000. Смесь инкубировали при 0-4°C в течение ночи (12 ч) и снова центрифугировали. TNE добавляли в таблетку, чтобы довести до объема 7,5 мл. В суспензию добавляли CSCI. Суспензию центрифугировали, чтобы удалить протеины. Далее, в верхний слой добавляли 300-500 мг/мл бромида этидия и смесь переносили в пробирку для центрифугирования. Пробирку запаивали нагреванием и подвергали ультрацентрифугированию. ДНК удаляли, используя перистальтический насос. В ДНК, чтобы удалить бромид этидия, добавляли несколько больше, чем равное количество изопропилового спирта, насыщенного водой. Пробу ДНК подвергали диализу относительно ТЕ, что приводило к образованию примерно 3 мл рекомбинантной ДНК. Полученную таким образом рекомбинантную плазмиду, содержащую ДНК-фрагмент в 4,6 ко, переваривали как рPCN1 (Рекомбинантную плазмиду, содержащую ДНК-фрагмент в 4,5 ко, переваривали как рPCN3).

Эти ДНК плазмид переваривали при помощи Eco RI, Bam HI, Pst I, Sac I и Sal I. Карты рестрикции конструировали и они приведены на фиг.6.

7) Анализ ДНК-последовательности.

Расположение гена нитрилгидратазы в ДНК-фрагментах рPCN1 и рPCN3 определяли при помощи карты рестрикции и использованием процедуры гидролиза Саутерна. Основываясь на этих результатах, анализировали ДНК-фрагмент Bam HI - Hinc II при помощи процедуры Сангера (Сангер, Ф., Science, т.214, с. 1205-1210, (1981)), используют вектор фага M13. ДНК-фрагмент в 2456 ко из *Pseudomonas chlororaphis* B23 приведен на фиг.4.

Вся нуклеотидная последовательность, полученная из аминокислотной последовательности, определенной в [1], была обнаружена в последовательности в соответствии с описанием, приведенным выше. Анализ последовательности также обнаруживали, что этот ДНК-фрагмент содержал последовательность, кодирующую  $\alpha$ - и  $\beta$ -субблоки.

8) Вставка ДНК-фрагмента Bam HI - Hinc II в вектор экспрессии и трансформации.

Фрагмент Sph I - Bam HI в 2,2 ко в рPCN1 и фрагмент Bam HI - Sal I в 4,7 ко в рPCN3 расщепляли, оба фрагмента подвергали лигации (фиг.3). Фрагмент после лигации вставляли в сайт Sph I - Sal I вектора экспрессии рVC19 и полученную конструкцию обозначали как рPCN4.

*E. coli* JM105 трансформировали при помощи рPCN4 точно так же, как это делали в (5), и трансформант обозначали через JM105/pPCN4 (FERM BP-2779).

9) Производство нитрилгидратазы, используя трансформант, и превращение нитрилов в амиды, используя нитрилгидратазу.

JM105/pPCN4 прививали в 10 мл среды 2 х УТ, содержащей 50  $\mu$ г/мл ампициллина, и

инкубировали при 26,5°C в течение ночи (12 ч). 100  $\mu$  л полученной в результате культуры добавляли в 10 мл среды 2 x УТ (50 г/мл ампициллина, 50 мг/л  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 10 мг/л  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1 мг/л пирролохинолинхонона).

Эту смесь инкубировали при 26,5°C в течение 5 ч. В смесь добавляли IPTG до финальной концентрации 1 мм. Смесь инкубировали при 26,5°C в течение 10 мин. После сбора клеток клетки суспендировали в 5 мл 1/20 М фосфатного буфера (pH 7,7). В 0,1 мл суспензии добавляли 10  $\mu$  л раствора субстрата (1М акрилонитрила). Смесь инкубировали при 20°C в течение 20 мин. В качестве контрольного испытания использовали смесь, полученную при помощи аналогичной процедуры, что была описана выше, но из E. coli JM105. Реакционную смесь испытывали на присутствие акриламида (продукта ферментной реакции) и акрилонитрила, используя ЖХВД. Акриламид, но не акрилонитрил обнаруживали в реакционной смеси JM105 pPCN4, в то время, как акрилонитрил, а не акриламид обнаруживали в реакционной смеси JM105.

#### Формула изобретения:

ФРАГМЕНТ НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ, КОДИРУЮЩИЙ ПОЛИПЕПТИД, ОБЛАДАЮЩИЙ АКТИВНОСТЬЮ НИТРИЛГИДРАТАЗЫ, РЕКОМБИНАНТНАЯ ПЛАЗМИДНАЯ ДНК pPCL 4, КОДИРУЮЩАЯ ПОЛИПЕПТИД, ОБЛАДАЮЩИЙ АКТИВНОСТЬЮ НИТРИЛГИДРАТАЗЫ,

ШТАММ БАКТЕРИЙ ESCHERICHIA COLI - ПРОДУЦЕНТ ПОЛИПЕПТИДА, ОБЛАДАЮЩЕГО АКТИВНОСТЬЮ НИТРИЛГИДРАТАЗЫ, СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ НИТРИЛГИДРАТАЗЫ.

5 1. Фрагмент нуклеиновой кислоты, кодирующий полипептид, обладающий активностью нитрилгидратазы, полученный путем клонирования гена нитрилгидратазы, происходящего из *Pseudomonas chlororaphis*-B23, со следующей нуклеотидной последовательностью, приведенной в описании изобретения.

10 2. Рекombинантная плазмидная ДНК pPCL4, кодирующая полипептид, обладающий активностью нитрилгидратазы, размером 9,574 т.п.о., содержащая Sph1 - Sal1-фрагмент нуклеиновой кислоты, кодирующий полипептид, обладающий свойствами нитрилгидратазы из *Pseudomonas chlororaphis*-B23 размером 6,9 т.п.о., Sal1 - Sph1-фрагмента ДНК вектора pUC19, размером 2,674, т.п.о., уникальные сайты рестрикции: два сайта Sal1, по одному сайту Sph1, Bam H1, Sac1, Bgl1, Hinc11, генетические маркеры Amp<sup>r</sup> - ген устойчивости к ампициллину.

25 3. Штамм бактерий *Escherichia coli* FERM BP-2779 - продуцент полипептида, обладающего активностью нитрилгидратазы.

4. Способ получения нитрилгидратазы, заключающийся в том, что культивируют штамм бактерий *Escherichia coli* FERM BP-2779 и извлекают нитрилгидратазу из культуральной среды.

35

40

45

50

55

60





(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 028 380** <sup>(13)</sup> **C1**  
(51) МПК<sup>6</sup> **C 12 N 15/31, 9/14, C 12 P**  
**13/02, C 12 N 9/78**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО  
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

(21), (22) Заявка: 4895024/13, 27.02.1991

(30) Приоритет: 28.02.1990 JP 48079/90

(46) Дата публикации: 09.02.1995

(56) Ссылки: 1. Патент США N 4637982, кл. C 12P 13/02, 1987. 2. Патент EP N 0243967, кл. C 12N 9/98, 1987. 3. Патент EP N 0204555, кл. C 12P 13/02, 1987.

(71) Заявитель:

Нитто Кемикал Индастриз Ко., Лтд. (JP),  
Терухико Беппу (JP),  
Хидеаки Ямада (JP)

(72) Изобретатель: Терухико Беппу[JP],

Хидеаки Ямада[JP], Тору  
Нагасава[JP], Суэхару Хориноути[JP], Макато  
Нисияма[JP]

(73) Патентообладатель:

Нитто Кемикал Индастриз Ко., Лтд. (JP),  
Терухико Беппу (JP),  
Хидеаки Ямада (JP)

(54) ФРАГМЕНТ НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ, КОДИРУЮЩИЙ ПОЛИПЕПТИД, ОБЛАДАЮЩИЙ АКТИВНОСТЬЮ НИТРИЛГИДРОТАЗЫ, РЕКОМБИНАНТНАЯ ПЛАЗМИДНАЯ ДНК PPCL 4, КОДИРУЮЩАЯ ПОЛИПЕПТИД, ОБЛАДАЮЩИЙ АКТИВНОСТЬЮ НИТРИЛГИДРАТАЗЫ, ШТАММ БАКТЕРИЙ ESCHERICHIA COLI - ПРОДУЦЕНТ ПОЛИПЕПТИДА, ОБЛАДАЮЩЕГО АКТИВНОСТЬЮ НИТРИЛГИДРАТАЗЫ, СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ НИТРИЛГИДРАТАЗЫ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии и генетической инженерии, в частности к получению ферментов клетчатого метаболизма. Сущность изобретения состоит в том, что из *Pseudomonas chlororaphis* B23 получен фрагмент ДНК, который кодирует полипептид, обладающий активностью

нитрилгидратазы и способный гидратировать нитрилы в амиды. Получена рекомбинантная ДНК, содержащая этот ген, и трансформант, образованный путем трансформации штамма *E. coli* этой рекомбинантной ДНК. Изобретение, кроме того, включает способ получения нитрилгидратазы, используя трансформант. 4 с.п. ф-лы, 10 ил.

RU 2 028 380 C1

RU 2 028 380 C1

10 083820 RU 2028380 C1

$\alpha$  subunit

$\alpha_1$ : Ser-Thr-Ser-Ile-Ser-Thr-Ala-Thr-Pro-Ser-Thr-Pro-Gly-Glu-Arg-Ala-Trp-Ala-Leu-Phe-Gln-Val-Leu-Lys-<sup>25</sup>

$\beta$  subunit

$\beta_1$ : Met-Asp-Gly-Phe-His-Asp-Leu-Gly-Gly-Phe-Gln-Gly-Phe-Gly-Lys-Val-Pro-His-Thr-Ile-Asn-Ser-Leu-<sup>20</sup>

*$\Phi u2.1$*

RU 2028380 C1

RU 2028380 C1

SphI  
 GCATGCTTTCCACATCTGGAACGTGATCGCCACGGACGGTGGTG  
 CCTACCAGATGTTGGACGGCAACGGATACGGCATGAACGCCGAAG  
 GTTTGTACGATCCGGAACTGATGGCACACTTTGCTTCTCGACGCA  
 TTCAGCACGCCGACGCTCTGTCCGAAACCGTCAAACCTGGTGGCCC  
 TGACCGGCCACACGGCATCACCAACCTCGGGCGGCGAGCTACG  
 GCAAAGCCCCGGAACCTCGTACCGCTTGGCCGGCGCCGCTACGACA  
 CTGCCTTGAGACAATTTCGACGTCTTGGTGATGCCAACGCTGCCCT  
 ACGTCGCATCCGAATTGCCGGCGAAGGACGTAGATCGTGCAACCT  
 TCATCACCAAGGCTCTCGGGATGATCGCCAACACGGCACCATTCCG  
 ACGTGACCGGACATCCGTCCCTGTCCGTTCCGGCCGGCCTGGTGA  
 ACGGGGTTCCGGTCCGAATGATGATCACCGGCAGACACTTCGACG  
 ATGCGACAGTCCTTTCGTGTCCGACGGCGATTTCGAAAAGCTTCGCG  
 GCGGGTTTCCGACGCCGGCCGAACGCGCCTCCAACCTCTGCACCAC  
 AACTCAGCCCCCGCCTAGTCTCTGACCGCACTGTCAGACAACAATTTC  
 CACCGATTACACATGATCAGCCACACATAAGAAAAGGTGAACCAG  
 ATGTCAGTAACGATCGACCACACAACGGAGAACGCCCGCACCGGCC  
 MetSerValThrIleAspHisThrThrGluAsnAlaAlaProAla  
 Subunit α  
 CAGGCGCGGTCTCCGACCGGGCGTGGGCACTGTTCCGCGCACTC  
 GlnAlaAlaValSerAspArgAlaTrpAlaLeuPheArgAlaLeu

фиг. 2

RU 2028380 C1

RU 2028380 C1

Kpn I  
 GACGGTAAGGGATTGGTACCCGACGGTTACGTCGAGGGATGGAAG  
 AspGlyLysGlyLeuValProAspGlyTyrValGluGlyTrpLys  
 AAGACCTCCGAGGAGGACTTCAGTCCAAGGCGCGGAGCGGAATTG  
 LysThrSerGluGluAspPheSerProArgArgGlyAlaGluLeu  
 Pvu II  
 GTAGCCGCGGCATGGACCGACCCCGAGTTCCGGCAGCTGCTTCTC  
 ValAlaArgAlaTrpThrAspProGluPheArgGlnLeuLeuLeu  
 Kpn I  
 ACCGACGGTACCGCCGAGTTGCCAGTACGGATACCTGGGCCCC  
 ThrAspGlyThrAlaAlaValAlaGlnTyrGlyTyrLeuGlyPro  
 CAGGCGGCCTACATCGTGGCAGTCCGAGACACCCGACACTCAAG  
 GlnAlaAlaTyrIleValAlaValGluAspThrProThrLeuLys  
 AACGTGATCGTGTGCTCGCTGTGTTTCATGCACCGCGTGGCCCATC  
 AsnValIleValCysSerLeuCysSerCysThrAlaTrpProIle  
 CTCGGTCTGCCACCCACCTGGTACAAGAGCTTCGAATACCGTGCG  
 LeuGlyLeuProProThrTrpTyrLysSerPheGluTyrArgAla  
 CGCGTGGTCCGCGAACCACGGAAGGTTCTCTCCGAGATGGGAACC  
 ArgValValArgGluProArgLysValLeuSerGluMetGlyThr  
 GAGATCGCGTCGGACATCGAGATTCCGCGTCTACGACACCACCGCC  
 GluIleAlaSerAspIleGluIleArgValTyrAspThrThrAla  
 GAAACTCGCTACATGGTCCTCCCGCAGCGTCCCGCCGGCACCAGAA  
 GluThrArgTyrMetValLeuProGlnArgProAlaGlyThrGlu  
 Pst I  
 GGCTGGAGCCAGGAACAACCTGCAGGAAATCGTCACCAAGGACTGC  
 GlyTrpSerGlnGluGlnLeuGlnGluIleValThrLysAspCys  
 CTGATCGGGGTTGCAATCCCGCAGGTTCCCAACCGTCTGATCACCC  
 LeuIleGlyValAlaIleProGlnValProThrValTRM  
 CGACAAGAAGGAAGCACACC-ATGGATGGAGTACACGATCTTGCC  
 MetAspGlyValHisAspLeuAla  
 Subunit  $\beta$   
 $\phi$ 42.3

RU 2028380 C1

RU 2028380 C1

<sup>1350</sup>  
GGAGTACAAGGCTTCGGCAAAGTCCCGCATACCGTCAACGCCGAC  
GlyValGlnGlyPheGlyLysValProHisThrValAsnAlaAsp

<sup>1400</sup>  
ATCGGCCCCACCTTTTCACGCCGAATGGGAACACCTGCCCTACAGC  
IleGlyProThrPheHisAlaGluTrpGluHisLeuProTyrSer  
Sal I

<sup>1450</sup>  
CTGATGTTTCGCCGGTGTCCCGAAGTCCGGGGCCTTCAGCGTCGAC  
LeuMetPheAlaGlyValAlaGluLeuGlyAlaPheSerValAsp

<sup>1500</sup>  
GAAGTCCGATACGTCCGTCCGAGCGGATGGAGCCGGGCCACTACATG  
GluValArgTyrValValGluArgMetGluProGlyHisTyrMet

<sup>1550</sup>  
ATGACCCCGTACTACGAGAGGTACGTTCATCGGTGTCCGACATTG  
MetThrProTyrTyrGluArgTyrValIleGlyValAlaThrLeu

<sup>1600</sup>  
ATGGTCCGAAAAGGGAATCCTGACGCAGGACGAACTCGAAAGCCTT  
MetValGluLysGlyIleLeuThrGlnAspGluLeuGluSerLeu

<sup>1650</sup>  
GCGGGGGGACCGTTCCCACTGTCACGGCCCAGCGAATCCGAAGGG  
AlaGlyGlyProPheProLeuSerArgProSerGluSerGluGly

<sup>1700</sup>  
CGGCCGGCACCCGTCGAGACGACCACCTTCGAAGTCCGGGCAGCGA  
ArgProAlaProValGluThrThrThrPheGluValGlyGlnArg

<sup>1750</sup>  
GTACGCGTACGCGACGAGTACGTTCCGGGGCATATTCGAATGCCT  
ValArgValArgAspGluTyrValProGlyHisIleArgMetPro

<sup>1800</sup>  
GCATACTGCCGTGGACGAGTGGGAACCATCTCTCATCGAACTACC  
AlaTyrCysArgGlyArgValGlyThrIleSerHisArgThrThr

<sup>1850</sup>  
GAGAAGTGGCCGTTTCCCGACGCAATCGGCCACGGGCGCAACGAC  
GluLysTrpProPheProAspAlaIleGlyHisGlyArgAsnAsp

<sup>1900</sup>  
GCCGGCGAAGAACCGACGTACCACGTGAAGTTCGCCGCCGAGGAA  
AlaGlyGluGluProThrTyrHisValLysPheAlaAlaGluGlu  
Sal I

<sup>1950</sup>  
TTGTTCCGCTAGCGACACCGACGGTGGAAAGCGTTCGTTGTCGACCTC  
LeuPheGlySerAspThrAspGlyGlySerValValValAspLeu

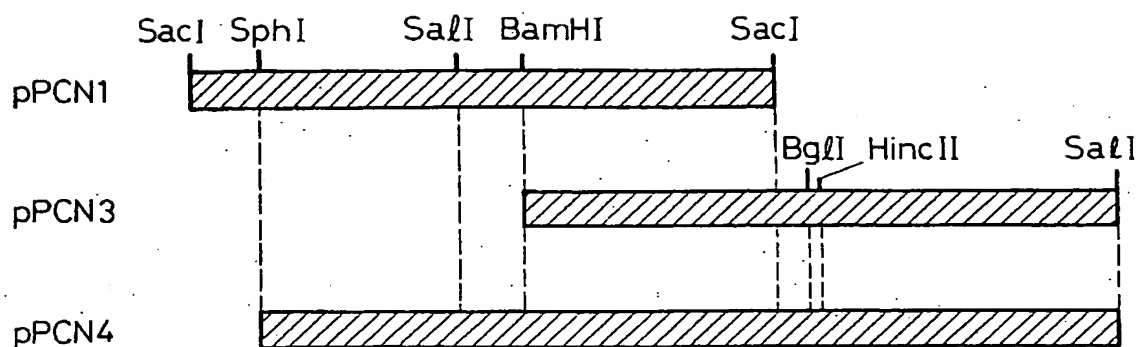
φu2.4

<sup>2000</sup>  
TTCGAGGGTTACCTCGAGCCTGCGGCCTGATCTTCCAGCATTCCA  
PheGluGlyTyrLeuGluProAlaAlaTRM

<sup>2050</sup>  
GGCGGGCGGTACCGGATCACAGCGGTTCTGTCCGACCGCCGCCTGA  
TCACCACGATTCACTCATTCCGGAAGGACACTGGAAATCATGGTGC  
Sal I  
AC

φu2.5

RU 2028380 C1



10 20 30 40 50 60  
 GGATCCCGTCTGGCCTTCTGCGGTACCTACGGCATGAAGCCACCCACGGCCTGGTGCCCT  
 70 80 90 100 110 120  
 ACACCGGCGTCATGGCGATTGAAGCCACGATCGATCATGTGCGCCCATCACCGGTAACG  
 130 140 150 160 170 180  
 TGGCGGACAACGGCGTGATGCTGCAGGCAATGGCCGGTGACAGCGGACTCGACCCGCGCC  
 190 200 210 220 230 240  
 AGGCGGCGCCTCAGGTGCGATGACTATTGCAGTTACCTGGAAAAAGGCGTGAGCGGACTCA  
 250 260 270 280 290 300  
 GAATCGGGGTGTTGCAAGAGGGGATTCCGCGCTTGCTAACAGGACCCTCGCGTGCGGACA  
 310 320 330 340 350 360  
 AAGTGCGCGACGCCATCGCCCGACTCGAGGCGTTGGGCGCTCATGTCGAGCCGGTCTCCA  
 370 380 390 400 410 420  
 TTCCCGAGCACAACCTGGCAGGGTGTGTTGGCACCCCATCGGTTGCGAAGGCTTGACCA  
 430 440 450 460 470 480  
 TGCAGATGATGCATGGCAACGGCCGAGGCTTTAACTGGAAAGGACTTTACGATGTCGGCC  
 490 500 510 520 530 540  
 TGCTGGACAAACAAGCCAGCTGGCGCGACGACGAGACCAATTATCCGCGTCGCTCAAGC  
 550 560 570 580 590 600  
 TCTGCATGTTGTCGGCCAATACGGCCTGTGCGCTACAACGGACGCTACTACGCCAAGG  
 610 620 630 640 650 660  
 CCCAGAACCTTGACGCTTTGCCCCGGCAGGGATACGACAAAGCGCTGCAAACCTATGACC  
 670 680 690 700 710 720  
 TGCTGGTGATGCCGACCACGCCCATCAGGCCCAACCCACCCGCGCAGCGAACTGCTCGA

$\phi$ u2.7

RU 2028380 C1

RU 2028380 C1

<sup>730</sup>TCACGGAGTACGTGGCTCGCGCGTTGGAATGATCGGCAATACCGCGCCACAGGACATCA<sup>780</sup>  
<sup>790</sup>CCGGGCATCCGGCCATGTCGATTCCGTGTGGCCTGCTGGACGGCCTGCCCGTCCGGGCTGA<sup>840</sup>  
<sup>850</sup>TGCTGGTCGCAAAACACTACGCCGAGGGCAGGATTTACCAAGCGGCGGCGGCGTTTGAAG<sup>900</sup>  
<sup>910</sup>CCTCGGTGGACTGGCGCACGCTCTGAGCCTTTTACAGGCGCGCGCCCCCTGAAGAACGA<sup>960</sup>  
<sup>970</sup>TAAGAAAGACCGGCAAGTTGCAATGACTTTTCAACCGCGTTGACTGATAGGAGTTACCCC<sup>1020</sup>  
<sup>1030</sup>ATGAGTACATCTATTTCCACGACTGCGACACCTTCGACACCGCGGAGAGGGCATGGGCC<sup>1080</sup>  
MetSerThrSerIleSerThrThrAlaThrProSerThrProGlyGluArgAlaTrpAla  
Subunit  $\alpha$   
<sup>1090</sup>TTGTTTCAAGTGCTCAAGAGCAAGGAACCTCATCCCAGAGGGCTATGTCGAGCAGCTCACT<sup>1140</sup>  
LeuPheGlnValLeuLysSerLysGluLeuIleProGluGlyTyrValGluGlnLeuThr  
<sup>1150</sup>CAATTGATGGCCCATGACTGGAGCCCGGAGAACGGCGCTCGCGTGGTCCGCAAGGCATGG<sup>1200</sup>  
GlnLeuMetAlaHisAspTrpSerProGluAsnGlyAlaArgValValAlaLysAlaTrp  
<sup>1210</sup>GTCGATCCGCAGTTCCGGGCGCTGCTGCTCAAGGACGGAACAGCGCTTGCGCGCAGTTC<sup>1260</sup>  
ValAspProGlnPheArgAlaLeuLeuLeuLysAspGlyThrAlaAlaCysAlaGlnPhe  
<sup>1270</sup>GGCTACACCGGCCCCACAAGGCGAATACATCGTCGCCCTGGAAGATACACCGGGGGTGAAG<sup>1320</sup>  
GlyTyrThrGlyProGlnGlyGluTyrIleValAlaLeuGluAspThrProGlyValLys  
<sup>1330</sup>AACGTCATCGTCTGCAGCCTGTGCTCCTGCACCAACTGGCCGCTCCTCGGCCTGCCGCC<sup>1380</sup>  
AsnValIleValCysSerLeuCysSerCysThrAsnTrpProValLeuGlyLeuProPro  
<sup>1390</sup>GAGTGGTACAAGGGCTTTGAGTTTTCGTGCGCGCCTGGTCCGGGAGGGGCGCACCGTACTG<sup>1440</sup>  
GluTrpTyrLysGlyPheGluPheArgAlaArgLeuValArgGluGlyArgThrValLeu

φu2.8

RU 2028380 C1

RU 2028380 C1

RU 2028380 C1

1450 1460 1470 1480 1490 1500  
 CGCGAGCTGGGGACGGGAGTTGCCGAGCGACACGGTCATCAAAGTCTGGGATACCAGCGCC  
 ArgGluLeuGlyThrGluLeuProSerAspThrValIleLysValTrpAspThrSerAla  
 1510 1520 1530 1540 1550 1560  
 GAAAGCCGTTACCTGGTGTGGCCGAAAGGCCTGAAGGCTCTGAGCACATGAGTGAAGAA  
 GluSerArgTyrLeuValLeuProGlnArgProGluGlySerGluHisMetSerGluGlu  
 1570 1580 1590 1600 1610 1620  
 CAGCTTCAACAGCTGGTGACCAAAGACGTGCTGATTGGCGTCGCCCTGCCACGCGTTGGC  
 GlnLeuGlnGlnLeuValThrLysAspValLeuIleGlyValAlaLeuProArgValGly  
 1630 1640 1650 1660 1670 1680  
 TGAGAAAAACAACATCATCGTTCAACTTGGCGAGTTTTCATTATGGATGGCTTTTCAC  
 MetAspGlyPheHis  
 Subunit β

1690 1700 1710 1720 1730 1740  
 GATCTCGGCGGTTTCCAAGGCTTTGGCAAAGTGCCGCACACCATCAACAGCCTCAGCTAC  
 AspLeuGlyPheGlnGlyPheGlyLysValProHisThrIleAsnSerLeuSerTyr  
 1750 1760 1770 1780 1790 1800  
 AAACAGGTTTTCAAGCAGGACTGGGAACACCTGGCCTATAGCTTGATGTTTGTGGCGGTT  
 LysGlnValPheLysGlnAspTrpGluHisLeuAlaTyrSerLeuMetPheValGlyVal  
 1810 1820 1830 1840 1850 1860  
 GACCAATTGAAAAAGTTTCAGCGTGGACGAAGTGCCTCATGCCGTGGAACGCCTGGACGTT  
 AspGlnLeuLysLysPheSerValAspGluValArgHisAlaValGluArgLeuAspVal  
 1870 1880 1890 1900 1910 1920  
 CGCCAGCATGTCGGCACCCAGTACTACGAACGCTACATCATCGCGACCGCCACGCTGCTG  
 ArgGlnHisValGlyThrGlnTyrTyrGluArgTyrIleIleAlaThrAlaThrLeuLeu  
 1930 1940 1950 1960 1970 1980  
 GTGGAAACGGCGTTATCACCCAGGCGGAGCTCGATCAGGCATTGGGTTCCCACTTCAAG  
 ValGluThrGlyValIleThrGlnAlaGluLeuAspGlnAlaLeuGlySerHisPheLys  
 1990 2000 2010 2020 2030 2040  
 CTGGCGAACCCCGCCCATGCGACAGGTGCGCCGGCGATCACCGGCAGGCGCCCTTCGAA  
 LeuAlaAsnProAlaHisAlaThrGlyArgProAlaIleThrGlyArgProProPheGlu  
 2050 2060 2070 2080 2090 2100  
 GTGGGGCATCGGCTTGTGGTTCCGAGACGAATATGTGGCGGGCATATCCGCATCGCGGCC  
 ValGlyAspArgValValValArgAspGluTyrValAlaGlyHisIleArgMetProAla  
 2110 2120 2130 2140 2150 2160  
 TACGTGCGCGGTAAGGAAGGCGTGGTCTGACCCGCACCTCAGAGCAGTGGCCCTTCCCC  
 TyrValArgGlyLysGluGlyValValLeuHisArgThrSerGluGlnTrpProPhePro

φu2.9

2170 2180 2190 2200 2210 2220  
 GACGCCATTGGCCACGGCGACTTGAGCGCAGCCCATCAGCCTACCTACCACGTGAGTTT  
 AspAlaIleGlyHisGlyAspLeuSerAlaAlaHisGlnProThrTyrHisValGluPhe  
 2230 2240 2250 2260 2270 2280  
 CGCGTGAAAGATCTATGGGGTGACGCGGAGATGACGGTTACGTGCTGGTTCGATCTTTTC  
 ArgValLysAspLeuTrpGlyAspAlaAlaAspAspGlyTyrValValValAspLeuPhe  
 2290 2300 2310 2320 2330 2340  
 GAAAGCTACTTGGATAAGGCCCCCGGTGCCCAAGCGGTGAACGCATGATTGAAGGCGCCC  
 GluSerTyrLeuAspLysAlaProGlyAlaGlnAlaValAsnAla  
 2350 2360 2370 2380 2390 2400  
 AGCGCGGCGGACTGCCGGTGACGGTCCTTTCCGGCTTCCTCGGCGCGGCAAAACCAACC

2410 2420 2430 2440 2450  
 TGCTCAACGCTATCCTGCCAAATCGCCAAGGACTGCGGGTCGCGGTTCATCGTCAAC

φu2.10

RU 2028380 C1